



TITLE:

PARI Regulates Stalled Replication Fork Processing To Maintain Genome Stability upon Replication Stress in Mice(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Mochizuki, Ayako

CITATION:

Mochizuki, Ayako. PARI Regulates Stalled Replication Fork Processing To Maintain Genome Stability upon Replication Stress in Mice. 京都大学, 2018, 博士(医科学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21026>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-05-14に公開

京都大学	博士（医科学）	氏 名	望 月 綾 子
論文題目	PARI Regulates Stalled Replication Fork Processing To Maintain Genome Stability upon Replication Stress in Mice (マウス PARI は停止した複製フォークの処理を制御することにより複製ストレス存在下のゲノム安定性を保つ)		
(論文内容の要旨)			
<p>DNA 複製は様々な要因により頻繁に損傷を受けるが、正常な細胞増殖や生体恒常性を維持するためにゲノム DNA は安定に保たれなければならない。初期胚細胞や各種幹細胞など増殖活性の高い細胞は恒常的に内因性複製ストレスに曝されており、これらの細胞では特に DNA 複製と DNA 修復の協調によるゲノム安定性維持機構が重要であると考えられる。</p> <p>本論文は、大腸菌 UvrD ヘリケースに一部相同性を示し、多能性幹細胞や生殖細胞で特徴的に高い発現が認められるマウス <i>Pari</i> 遺伝子の遺伝子欠損マウスを作出して機能解析を行った。</p> <p><i>Pari</i> 遺伝子は、これまでにヒト培養細胞株とニワトリ DT40 細胞株を用いた研究により、RAD51 および Pol δ を介して相同組換えを抑制する機能が報告されている。マウス成体組織では、精巣、卵巣、脾臓等で <i>Pari</i> の発現が認められ、またマウス ES 細胞で高い発現が観察された。<i>Pari</i> のマウス個体における生理機能を明らかにするために同遺伝子欠損マウスを作製したところ、通常の飼育条件下では正常に発生し、また雌雄共に生殖可能であった。</p> <p><i>Pari</i> のゲノム DNA ストレス下での機能の有無を検討するため、<i>Pari</i> 欠損 ES 細胞及び胎仔繊維芽細胞を用いて様々な DNA 損傷に対する細胞感受性を調べたところ、<i>Pari</i> 欠損により DNA 複製阻害に対して高い感受性を示す事が明らかとなった。また PARI 蛋白質は S 期の DNA 複製複合体への特異的な局在が観察されたことから PARI の DNA 複製への関与が示唆された。</p> <p>PARI の DNA 複製における機能を明らかにするため、DNA ファイバー実験を行い、<i>Pari</i> 欠損は通常の DNA 複製に影響しない一方、DNA 複製ストレス下における新生 DNA 鎖の短縮を減弱する事を明らかにした。また新生 DNA 鎖分解に働く MRE11 ヌクレアーゼおよび新生 DNA 鎖分解の抑制が示唆されている RAD51 と PARI の機能的な関係を調べた結果、PARI は RAD51 抑制を介して MRE11 による新生鎖分解を促進する事を明らかとした。更に、<i>Pari</i> 欠損細胞では DNA 複製ストレスに伴う DNA 二重鎖切断および DNA 複製開始点の新規発火が減少しており、PARI は DNA 複製の再開経路の選択に関与することが明らかとなった。</p> <p><i>Pari</i> 欠損 ES 細胞は外因性 DNA 複製ストレスに対して染色体不安定性を示し、また <i>Pari</i> 欠損マウス由来の骨髄細胞、精原細胞においても同様に DNA 複製ストレス存在下で染色体不安定が観察された。初期胚由来の ES 細胞は高い内因性 DNA 複製ストレスを持つ事が知られているが、<i>Pari</i> 欠損 ES 細胞では外因性 DNA 複製ストレスの非存在下で長期培養による染色体不安定性が観察されると共に、染色体不安定性の指標である小核の出現率上昇および染色体分配異常の増加が確認された。また興味深い事に <i>Pari</i> 欠損による小核増加や染色体分配異常は ES 細胞の分化誘導により抑制された。更に <i>Pari</i> 欠損マウスに薬</p>			

<p>剤投与による急性貧血を誘発し、赤血球造血時の内因性 DNA 複製ストレスを惹起したところ、<i>Pari</i> 欠損マウスでは貧血からの回復遅延と赤血球の小核増加が観察された。すなわち PARI は外因性および内因性 DNA 複製ストレス存在下でゲノム安定性を維持する役割を持つ事を明らかとした。</p> <p>以上の結果より本研究において、PARI は ① DNA 複製複合体に局在する事、② DNA 複製ストレス存在下において新生 DNA 鎖処理と DNA 複製再開を制御する事、③ マウス個体と細胞において内因性および外因性の DNA 複製ストレスに対する染色体安定性維持に関与する事、を明らかにした。</p>
<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p><i>Pari</i>は大腸菌UvrDヘリケースと一部相同性を示し、相同組換えに抑制的に働くことが報告されている。またDNAスライディングクランプであるPCNAとの相互作用が示唆されているが、これまでにDNA複製に関する具体的な役割及び個体における生理機能は不明であった。</p> <p>本論文では、新たに作製した<i>Pari</i>ノックアウトマウス及び<i>Pari</i>ノックアウトES細胞等の解析により、PARIがDNA複製ストレスにより停止したDNA複製フォークの制御を行うことで染色体安定性を保つことを明らかにした。PARIは恒常的にDNA複製複合体に局在するが、<i>Pari</i>ノックアウト細胞では通常のDNA複製に異常は認められない。一方、DNA複製ストレス存在下においてPARIは新生DNA鎖の短縮を促進し、DNA複製再開経路を制御する事を明らかにした。更にES細胞の培養系を用いてPARIが内因性及び外因性のDNA複製ストレスによる染色体分離異常を抑制し、染色体安定性の維持に働く事を明らかにした。またマウス個体においてもPARIは外因性DNA複製ストレス及び急速な細胞増殖による内因性DNA複製ストレスに対して染色体安定性維持に機能することを示した。</p> <p>以上の研究は、PARIのDNA複製フォークにおける機能解明に貢献し、哺乳類個体及び発生過程において、特に高いDNA複製ストレスに対する染色体安定性の維持機構の解明に寄与するところが大きい。</p> <p>従って、本論文は博士(医科学)の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお本学位授与申請者は、平成 30 年 2 月 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日：2018 年 5 月 14 日 以降